

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP05/002986

International filing date: 24 February 2005 (24.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-049282  
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 05 August 2005 (05.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24. 2. 2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 2月 25日

出願番号 Application Number: 特願 2004-049282

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

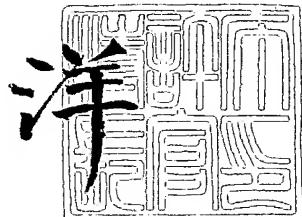
JP 2004-049282

出願人 Applicant(s): 国立大学法人 東京大学  
日研化学株式会社

2005年 7月 21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A41105M  
【提出日】 平成16年 2月25日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
  【住所又は居所】 東京都文京区本郷 2-32-2-1204  
  【氏名】 永井 良三  
【発明者】  
  【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿南 2-26-1-212  
  【氏名】 鈴木 亨  
【特許出願人】  
  【持分】 1/4  
  【識別番号】 594053419  
  【氏名又は名称】 永井 良三  
【特許出願人】  
  【持分】 1/4  
  【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿南 2-26-1-212  
  【氏名又は名称】 鈴木 亨  
【特許出願人】  
  【持分】 1/2  
  【識別番号】 000226404  
  【氏名又は名称】 日研化学株式会社  
【代理人】  
  【識別番号】 110000109  
  【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
  【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
  【予納台帳番号】 170347  
  【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
  【物件名】 特許請求の範囲 1  
  【物件名】 明細書 1  
  【物件名】 図面 1  
  【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。

【請求項 2】

血管リモデリング抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。

【請求項 3】

動脈硬化抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。

【請求項 4】

非環式ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 5】

非環式ポリプレニル系化合物が3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 6】

非環式ポリプレニル系化合物が(2E, 4E, 6E, 10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 7】

有効成分である非環式ポリプレニル系化合物とともに薬学的に許容される製剤用添加物を含む医薬組成物の形態である請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 8】

経口投与用の医薬組成物の形態である請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】転写因子KLF5の活性化抑制作用を有する医薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含み、転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、動脈硬化をはじめとする血管疾患が急増しており、高齢化社会を迎えたわが国において血管疾患の予防又は治療のための医薬の開発は非常に重要な課題である。血管平滑筋の増殖は、動脈硬化や虚血性心疾患の治療として行われる冠動脈血行再建術後の再狭窄の発症に深く関わっている。しかしながら、損傷した血管の平滑筋の性質や個体発生の過程にある血管の特徴・性質については未だ十分に解明されていない。平滑筋の分化と発生を担う分子機構の解明は、動脈硬化に代表される血管平滑筋が関与している血管疾患の予防薬・治療薬の開発の糸口となる可能性がある。また、平滑筋細胞は形質の可塑性を示すという特徴がある。正常な血管では分化した収縮型の形質の細胞が認められるのに対して、血管病変では増殖能を有する脱分化した平滑筋細胞への形質の変換が認められる。平滑筋細胞の脱分化の機序を理解することは、血管疾患の病態を解明し、さらに新しい治療法を開発するための糸口となる。

【0003】

本発明者らは、脱分化した平滑筋に特異的に発現する平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の発現調節の研究を通して、同遺伝子の発現調節を担う転写調節因子KLF5 (Kruppel-like factors5)/BTEB2/IKLF (以下、本明細書において「KLF5」と略す場合がある) を単離することに成功した(Circulation Research, 85, pp. 182-191, 1999)。KLF5は、胎児及び新生児期に血管に発現し、成体では発現が低下するが、動脈硬化等の血管病変では発現が誘導される。KLF5の発現を抑えるアンチセンス実験では平滑筋特異的に増殖が抑制されることから、KLF5は平滑筋の増殖を司る重要な因子と考えられる。従って、KLF5の活性を抑制する作用を有する医薬を開発すれば血管疾患の予防及び治療のための新しい医薬として有用であることが期待される。

【0004】

本発明者らは、KLF5が動脈硬化を悪化させるタンパクのプロモーターに結合して高い発現活性が誘導される特性を利用して平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法及びこのような評価方法に用いる宿主細胞を提供する方法を見出した（特開平11-318450号公報）。さらに、本発明者らはKLF5のノックアウト・マウスの作成にも成功した（Nature Medicine, 8, pp. 856-863, 2002）。このノックアウト・マウスでは、ホモ接合体は胎生致死性であり、また、ヘテロ接合体の成仔は一見正常であるが、血管障害に対する内膜過形成反応の低下、アンジオテンシンIIによる心肥大と線維化の低下などが顕著であった。さらに、ヘテロ接合体では、血小板由来増殖因子(PDGF)が野生型の半分程度にまで低下しており、PDGFがKLF5の転写制御の標的遺伝子であることが判明した。また、レチノイン酸誘導体(レチノイン酸アゴニスト:Am80)は、細胞を用いたレポーターアッセイでKLF5によるPDGF-Aの転写を抑制し、また、野生型マウスへの投与により障害血管の新生内膜形成を抑制した。一方、レチノイン酸アンタゴニストはPDGF-Aの転写を促進し、野生型マウスに投与したところ障害血管の新生内膜形成を促進した(Nature Medicine, 8, pp. 856-863, 2002)。

【0005】

一方、非環式ポリプレニル系化合物の一つである(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸（以下、この物質を本明細書において「NIK-333」と呼ぶ場合がある）は、レチノイン酸結合蛋白及びレチノイン酸受容体に対して親和性を示し、肝細胞癌に対して分化誘導作用及びアポトーシス誘導作用を有することが知られている。臨床においては、NIK-333は一年間の長期投与により肝癌根治治療後の再発を

有意に抑制し、肝癌再発抑制作作用を有することが示唆されている。さらに、NIK-333は、肝機能障害及び他のレチノイドに認められる副作用をほとんど有しておらず、安全性の高い医薬として有用である（N. Eng. J. Med., 334, pp. 1561-1567, 1996）。しかしながら、これまで非環式ポリプレニル系化合物が転写因子であるKLF5の活性化を抑制することは全く知られておらず、さらにこの物質が血管リモデリング抑制作用及び動脈硬化抑制作用を有することは知られていない。

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

###### 【0006】

本発明は、転写調節因子KLF5の活性化抑制作作用を有する医薬を提供することを課題としている。また、転写調節因子KLF5の活性化抑制作作用を有し、血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有する医薬を提供することも本発明の課題である。

##### 【課題を解決するための手段】

###### 【0007】

本発明者らは上記の課題を解決すべく、転写調節因子KLF5の活性化抑制作作用を有する化合物を鋭意探索した。その結果、NIK-333などの非環式ポリプレニル系化合物が転写調節因子KLF5の活性化を抑制すること、及び該非環式ポリプレニル系化合物が血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有することを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

###### 【0008】

すなわち、本発明により、転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬が提供される。また、本発明により、血管リモデリング抑制作作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬、及び動脈硬化抑制作作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬が提供される。

###### 【0009】

上記の発明の好ましい態様によれば、非環式ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である上記の医薬；非環式ポリプレニル系化合物が3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である上記の医薬；及び非環式ポリプレニル系化合物が(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である上記の医薬が提供される。さらに好ましい態様によれば、有効成分である非環式ポリプレニル系化合物とともに薬学的に許容される製剤用添加物を含む医薬組成物の形態である上記医薬；及び経口投与用の医薬組成物の形態である上記の医薬が提供される。

###### 【0010】

別の観点からは、上記の医薬の製造のための非環式ポリプレニル系化合物の使用；及びヒトを含む哺乳類動物の生体内において転写因子KLF5の活性化を抑制する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；血管リモデリングを抑制する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；及び動脈硬化を予防する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

##### 【発明の効果】

###### 【0011】

本発明の医薬は転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有しており、血管リモデリングの抑制及び動脈硬化の抑制などに有用である。

##### 【発明を実施するための最良の形態】

###### 【0012】

本発明の医薬の有効成分として用いられる非環式ポリプレニル系化合物は、数個の直鎖イソプレン単位を含む化合物のことである。非環式ポリプレニル系化合物の末端の官能基の種類は特に限定されない。例えば、末端に第一級アリル水酸基を有するポリプレニルア

ルコール（ポリプレノール）、ポリプレノールの末端水酸基が有機酸とエステルを形成した化合物、末端にカルボキシル基を有するポリプレニルカルボン酸などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。好ましくはポリプレニルカルボン酸を用いることができる。非環式ポリプレニル系化合物としては純粋な形態の任意の幾何異性体又は幾何異性体の任意の混合物を用いることができる。本発明に好適に用いられる非環式ポリプレニル化合物は3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸であり、特に好適には(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸を用いることができる。この化合物は特公昭63-32058号公報及びJ. Chem. Soc. (c), 2154, 1966に記載されている公知物質であり、上記刊行物に記載された方法により容易に製造できる。また、その他の非環式ポリプレニル化合物も上記刊行物に記載された方法を参照することにより当業者に容易に製造することができる。

#### 【0013】

本発明の医薬としては、非環式ポリプレニル系化合物をそのまま投与してもよいが、通常は1又は2種以上の製剤用添加物とともに医薬組成物を調製して投与することが望ましい。本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与又は非経口投与のいずれの投与経路を選択することも可能である。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤（素錠又は糖衣錠など）、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、溶液剤、カプセル剤（硬カプセル剤又は軟カプセル剤など）、又は懸濁剤などを挙げることができる。非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを挙げることができる。

#### 【0014】

製剤用添加物としては、例えば、安定化剤、界面活性剤、可塑剤、滑沢剤、可溶化剤、緩衝剤、甘味剤、基剤、吸着剤、矯味剤、結合剤、懸濁化剤、光沢化剤、コーディング剤、着香剤・香料、湿潤剤、湿潤調節剤、充填剤、消泡剤、咀嚼剤、清涼化剤、着色剤、糖衣剤、等張化剤、pH調節剤、軟化剤、乳化剤、粘着剤、粘着増強剤、粘稠剤、粘稠化剤、発泡剤、賦形剤、分散剤、噴射剤、崩壊剤、崩壊補助剤、芳香剤、防湿剤、防腐剤、保存剤、無痛化剤、溶剤、溶解剤、溶解補助剤、流動化剤などを挙げることができ、これらを2種以上組み合わせて用いてもよい。これらの製剤用添加物の具体例は、例えば、医薬品添加物事典（日本医薬品添加剤協会編集、薬事日報社発行）に説明されているので、当業者は医薬組成物の形態に応じて適宜の製剤用添加物を選択し、当業界で汎用の方法に従つて所望の形態の医薬組成物を製造することができる。例えば、製剤用添加物としてセルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、又は生物学的に調和する溶媒などを用いることができる。また、PCT/JP03/10440号の明細書には3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸を含む軟カプセル剤が開示されており、この軟カプセル剤は本発明の医薬として好適に利用可能である。

#### 【0015】

本発明の医薬はヒトを含む哺乳類動物において転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する。本発明の医薬の上記作用は、本明細書の実施例に具体的に説明した方法により当業者が容易に確認できる。また、本発明の医薬は、上記の転写因子KLF5活性化抑制作用に基づいて、血管リモデリング及び／又は動脈硬化を抑制する作用を有している。動脈硬化の進展にかかる高血圧などの病態では、血管にかかる種々の負荷に反応して血管壁の細胞構築が変化し、血管のリモデリングが生じることが知られている。血管リモデリングとは、血流量変化や血管壁の張力の変化などの血行動態変化に対してもたらされる血管の構造上の変化のことである。血管リモデリング及び／又は動脈硬化に対する本発明の医薬の抑制作用についても、本明細書の実施例に具体的に示した方法（例えば線維芽細胞の細胞増殖に対する抑制作用及びカフ障害モデルを用いた評価など）により当業者が容易に確認できる。

#### 【0016】

本発明の医薬の投与量及び投与回数は特に限定されないが、通常は有効成分重量として一日投与量を0.001 mg～1,200 mg程度の間で選択することができ、典型的には成人一日あ

たり100 mg～1,000 mg程度である。上記の投与量は患者の年齢や体重などの条件、疾患の種類などに応じて適宜増減することが望ましい。また、上記の一日投与量を数回に分けて投与することもできる。

### 【実施例】

#### 【0017】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

##### 例1：転写因子KLF5活性化に対する効果

COS1細胞を24ウェルプレートに $5 \times 10^6$ 個/ウェルの割合でまき、37°Cの5% CO<sub>2</sub>インキュベータで12時間培養した。トランスフェクションはTransFast（登録商標、プロメガ社製）トランスフェクション試薬を用い、そのプロトコールに従って行った。すなわち、pCAG/KLF5またはその空ベクター(pCAG)、pCMX/RAR $\alpha$ またはその空ベクター(pCMX)及びPDGF-A promoter(-900)-Luciferaseを添加し、37°Cの5% CO<sub>2</sub>インキュベータで48時間培養した。NIK-333はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して $10^{-7}$ ～ $10^{-5}$  Mとなるように添加した。その後、Dual Luciferase Reporter Assay System（プロメガ社製）を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果を図1に示す。KLF5の空ベクターとRAR $\alpha$ の空ベクター(Lane1)、KLF5のみの遺伝子導入(Lane2)、及びRAR $\alpha$ のみの遺伝子導入(Lane3)に比較してKLF5とRAR $\alpha$ の遺伝子導入によりPDGF-Aプロモーター活性化が認められた(Lane4)。このRAR $\alpha$ 強発現下におけるKLF5依存のPDGF-Aプロモーター活性化作用はNIK-333により抑制された(Lane5、6、7)。さらに、NIK-333の作用には $10^{-7}$  Mから濃度依存性が認められた。従って、NIK-333は転写因子KLF5活性化抑制作用を有することが分かった。

#### 【0018】

##### 例2：線維芽細胞3T3細胞増殖に対する効果

線維芽細胞由来である3T3細胞を24ウェルプレートに $1 \times 10^6$ 個/ウェルの割合でまき、12時間放置した。その後、NIK-333及びオールートランスレチノイン酸(ATRA)を $10^{-7}$ ～ $10^{-4}$  Mとなるように添加し24、36、及び48時間後に生細胞数を計測した。NIK-333とATRAはDMSOに溶解した。その結果、NIK-333は $10^{-7}$  Mから濃度依存性に細胞増殖を抑制し、その作用はATRAよりも強いことが確認された。従って、NIK-333は動脈硬化の原因とされている線維芽細胞の増殖を抑制し、動脈硬化を抑制する作用を有するものと考えられる。

#### 【0019】

##### 例3：マウスのカフ障害モデルにおける効果

カフ障害モデルを用いて血管リモデリング解析を行った。血管リモデリングに関してこのモデルの有用性が報告されている(Physiol. Genomics., 2, pp. 13-30, 2000; Circulation, 104, pp. 2716-2721, 2001; Circulation, 106, pp. 847-853, 2002)。実験には雄性C57BL6/Nマウス8週齢(10匹/群)を使用した。大豆油に溶解したNIK-333 50mg/kgをカフ処理(ポリエチレンチューブを血管の外側に被せる処理)7日前から屠殺前日まで1日1回連日経口投与した。対照として大豆油のみを同様に投与した。前投薬7日のうち右大腿動脈にカフとしてPE50(ポリエチレンチューブ50)を被せた。5週間後屠殺し採血、左心室穿刺灌流固定にてカフ取り上げを行った。病理評価はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。その結果、カフによる血管傷害で生じた血管内膜の肥厚は、NIK-333投与群ではコントロール群と比較してI/M(内膜/中膜)比の減少が認められた。

#### 【0020】

##### 【表1】

処置	I/M 比
溶媒(大豆油)	0.93 ± 0.35
NIK-333 50mg/kg	0.87 ± 0.29
NIK-333 100mg/kg	0.75 ± 0.31

## 【0021】

例4：マウス精巣重量に及ぼす影響

雄性C57BL6/Nマウス8週齢(10匹/群)を使用した。大豆油に溶解したNIK-333 50mg/kg及び100mg/kgを5週間1日1回連日経口投与した。対照として大豆油のみを同様に投与した。5週間後体重を測定し、屠殺後に精巣の肉眼的観察と精巣重量を測定した。その結果、NIK-333の5週間投与群(50及び100mg/kg)ではコントロール群と比較して体重及び精巣重量に変化は認められなかった。また、肉眼的観察においても精巣における異常所見は認められなかった。

## 【0022】

【表2】

処置	体重(g)	両側精巣重量(g)
溶媒(大豆油)	21.1±0.3	0.1437±0.0036
NIK-333 50mg/kg	20.8±0.3	0.1465±0.0043
NIK-333 100mg/kg	21.2±0.3	0.1360±0.0026

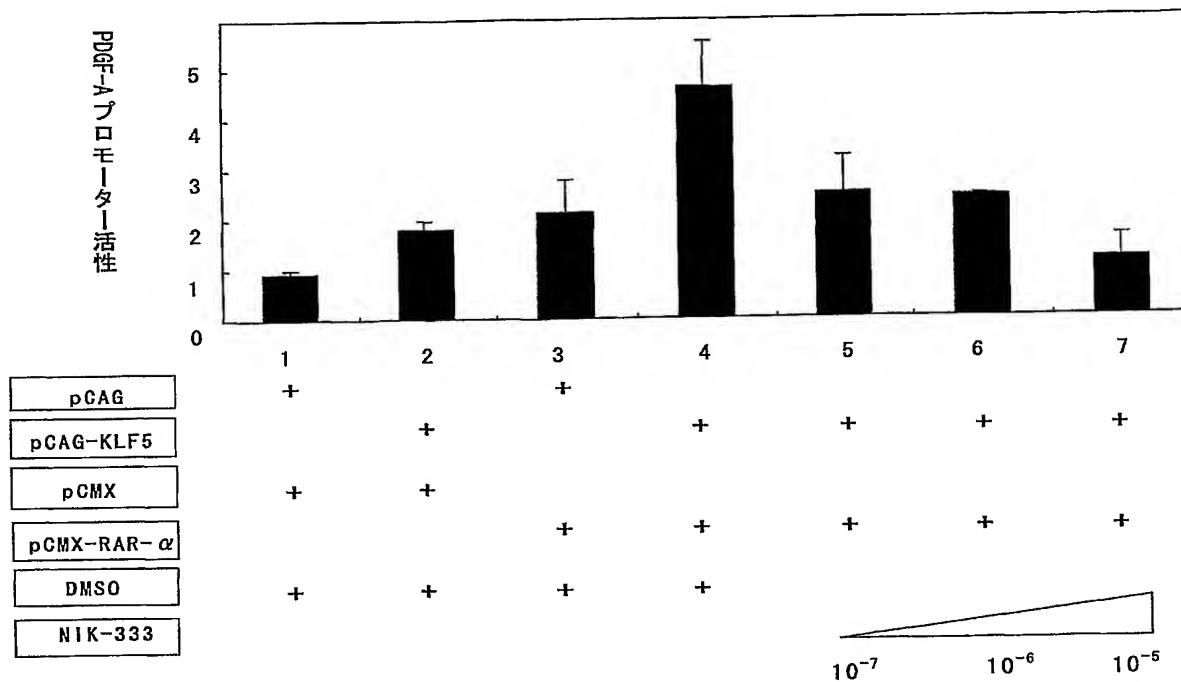
## 【図面の簡単な説明】

## 【0023】

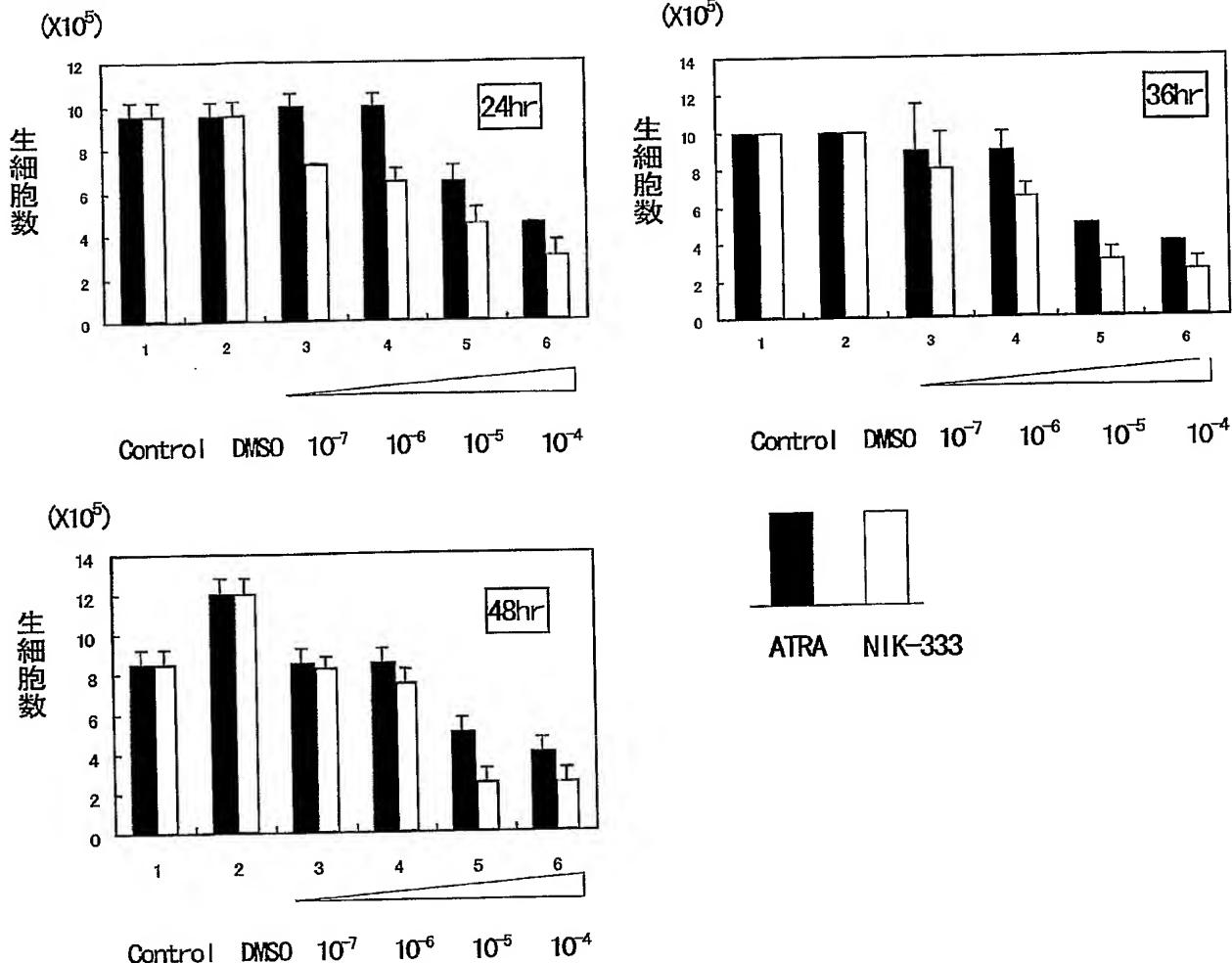
【図1】COS1細胞にKLF5とRARをコトランスフェクションさせ、NIK-333を負荷し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果を示す図である。

【図2】3T3細胞にNIK-333あるいはATRAを負荷し、24、36、及び48時間後の生細胞数を計測した結果を示す図である。

【書類名】 図面  
【図 1】



【図2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有し、血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有する医薬を提供する。

【解決手段】 転写因子KLF5の活性化を抑制し、血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物（例えば3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸などのポリプレニルカルボン酸など）を有効成分として含む医薬。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 A41105M  
【提出日】 平成16年11月19日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2004- 49282  
【承継人】  
    【持分】 1/2  
    【識別番号】 504137912  
    【氏名又は名称】 国立大学法人東京大学  
【承継人代理人】  
    【識別番号】 110000109  
    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
    【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 170347  
    【納付金額】 4,200円

**認定・付加情報**

特許出願の番号	特願2004-049282
受付番号	50401981098
書類名	出願人名義変更届
担当官	金井 邦仁 3072
作成日	平成17年 6月29日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

**【承継人】**

【識別番号】 504137912

【住所又は居所】 東京都文京区本郷7丁目3番1号

【氏名又は名称】 国立大学法人 東京大学

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 110000109

【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル  
8階

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

特願 2004-049282

出願人履歴情報

識別番号

[594053419]

1. 変更年月日

2003年10月10日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都文京区本郷 2-32-2-1204

氏 名

永井 良三

特願 2004-049282

出願人履歴情報

識別番号

[000226404]

1. 変更年月日

2003年 6月27日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区築地1丁目12番6号

氏 名

日研化学株式会社

特願 2004-049282

出願人履歴情報

識別番号

[504072783]

1. 変更年月日

2004年 2月25日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区恵比寿南 2-26-1-212

氏 名

鈴木 亨

特願 2004-049282

## 出願人履歴情報

識別番号

[504137912]

1. 変更年月日

2004年 4月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区本郷7丁目3番1号

氏 名

国立大学法人 東京大学